

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BRUNA AMARAL LAPINSCKI

PADRONIZAÇÃO DE MÉTODOS MOLECULARES PARA A DETECÇÃO
SIMULTÂNEA DE VÍRUS ENTÉRICOS EM AMOSTRAS FECAIS

CURITIBA
2014

BRUNA AMARAL LAPINSCKI

PADRONIZAÇÃO DE MÉTODOS MOLECULARES PARA A DETECÇÃO
SIMULTÂNEA DE VÍRUS ENTÉRICOS EM AMOSTRAS FECAIS

Trabalho de conclusão de curso apresentado como
requisito para avaliação da disciplina TCCII no
curso de Biomedicina, Setor Biológicas da
Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profª Drª Sônia Mara Raboni

CURITIBA
2014

AGRADECIMENTOS

Como agradecer é retribuir um pouco do bem que nos foi feito, temo que me falte espaço para retribuir a altura todo bem a mim realizado, responsável por me trazer até aqui.

Agradeço a minha orientadora Prof^a Dr^a Sônia M. Raboni pelo voto de confiança em aceitar a me orientar, pela diversidade de atividades que me designou - enriquecendo minha formação profissional - por todo aprendizado e orientação.

Agradeço a minha coordenadora de estágio Prof^a Dr^a Meri B. Nogueira, que me acompanhou diariamente no laboratório, que tanto contribuiu para a evolução do projeto e meu desenvolvimento profissional.

Agradeço a Mestre Luciane A. Pereira que participou ativamente em todas etapas do projeto e permitiu que eu passasse de colaboradora a responsável pelo estudo.

Agradeço ao Laboratório de Virologia – e sinto não poder discriminar um a um - por me aceitarem na equipe, por me acolherem e até me adotarem. Com todos vocês aprendi muito. Me tornei, sim, mais capacitada profissionalmente. Mas, mais do que isso, me tornei uma pessoa melhor. Obrigada por me ouvirem, por me apoiarem, pelos puxões de orelha, pelos sorrisos e gargalhadas, pelos abraços e por todos os mimos e preocupação. Neste laboratório me ensinaram mais que uma especialidade, adquiri o senso prático daquilo que vale a pena ser empreendido, daquilo que é belo e do que é moralmente correto.

Agradeço às pós-graduandas, pela troca de experiência, pelo que me ensinaram, pelo incentivo e apoio e por nunca terem feito eu me sentir a “café-com-leite” do grupo.

Agradeço àqueles que compreenderam as ausências, compartilharam de lágrimas e de muitos sorrisos. Àqueles que participaram dos últimos cinco anos, meses, ou tenham compartilhado quase uma vida inteira. Amigos, namorado, família, com vocês divido o mérito desta conquista. As alegrias de hoje também são suas, pois seu amor, estímulo e carinho foram as armas desta conquista.

Por fim agradeço àqueles que não estão ao alcance dos olhos, mas apenas do coração: a Deus e a minha mãe. Graças ao amor incondicional deles cresci acreditando ser capaz, basta eu acreditar e me dedicar. Sou o resultado da confiança e da força deles em minha vida.

RESUMO

As gastroenterites agudas (GA) constituem um importante problema de saúde pública. As causas dessa patologia podem ser agrupadas nas categorias principais: bacterianas, virais, parasitárias e não infecciosas. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) as infecções intestinais associadas a quadros diarreicos são a segunda causa de morte de origem infecciosa em todo o mundo, com prevalência estimada de 3 a 5 bilhões de casos ao ano. A maior incidência de GA é por etiologia viral, dos quais os quatro principais agentes são: adenovírus humano (HAdV), astrovírus humano (HAstV), norovírus (NoV) e rotavírus (RV). Estudos têm demonstrado que após a introdução da vacina para RV houve uma redução significativa nas hospitalizações e mortalidade devido às gastroenterites por RV. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um protocolo de detecção simultânea de HAdV, NoV e HAstV em amostras fecais utilizando metodologia de biologia molecular e, assim, identificar os vírus circulantes responsáveis por gastroenterite aguda no Hospital de Clínicas – UFPR (HC-UFPR). Foram selecionadas 51 amostras fecais diarreicas enviadas para investigação de rotavírus (RV) no Laboratório de Virologia HC-UFPR entre os meses de janeiro a outubro de 2014. Estas amostras foram processadas, clarificadas, seguindo-se das fases de extração do genoma, obtenção de cDNA, PCR *nested* para HAdV, RT-PCR para NoV e HAstV e visualização dos produtos amplificados em eletroforese de gel de agarose 2%. As amostras referentes aos controles positivos passaram ainda pelas fases de clonagem e purificação plasmidial. Verificou-se 13% (7) de amostras positivas para HAdV e 4% (2) para NoV. De todas amostras fecais enviadas ao Laboratório de Virologia HC-UFPR neste período, foi diagnosticado apenas um RV por meio do ensaio de ELISA. Desta forma observou-se que as GA virais foram referentes a 19% (10) das diarreias agudas avaliadas. A investigação de astrovírus ainda não foi realizada pois as análises prévias dos iniciadores disponíveis não apresentaram resultados conclusivos, optando-se pelo desenho e síntese de novos iniciadores, o que se encontra em andamento. Não foram observadas coinfeções. Dos pacientes infectados, 80% se tratavam de crianças das quais 40% eram menores que 2 anos. A padronização de uma técnica de diagnóstico mais específica e sensível como a de PCR mostrou que apesar da queda brusca dos casos de gastroenterites causadas por RV, as GA causadas por outros agentes etiológicos virais são significativas, principalmente entre pacientes pediátricos.

Palavras chave: gastroenterites, adenovirus, norovirus, astrovirus, PCR.

ABSTRACT

Acute gastroenteritis (GA) is an important public health problem. The causes of this condition can be grouped into major categories: bacterial, viral, parasitic and non infectious. According to the World Health Organization (WHO) intestinal infections associated with diarrheal diseases are the second leading cause of infectious origin deaths worldwide, with an estimated prevalence of 3 to 5 billion cases/year. The highest incidence of GA is by viral etiology, of which the four main pathogens are: human adenovirus (HAdV), human astrovirus (HAstV), norovirus (NoV) and rotavirus (RV). Studies have shown that after RV vaccine introduction there was a significant reduction in hospitalizations and mortality due to RV gastroenteritis. Therefore, the objective of this work was to develop a simultaneous detection protocol HAdV, NoV and HAstV in fecal samples using molecular biology methodology and identify the circulating virus in patients with acute gastroenteritis at the Hospital de Clinicas - UFPR (HC- UFPR). Between January to October 2014, it was analyzed a total of 51 diarrheal stool samples sent to rotavirus diagnosis (RV) in Virology Laboratory (HC –UFPR). These samples were processed by clarification and followed to genome extraction, cDNA synthesis, nested PCR for HAdV and RT-PCR for NoV and HAstV detections, and visualization of amplicons on 2% agarose gel electrophoresis. Positive controls were passed through the stages of cloning and plasmid miniprep. It has been found 14% (7) of positive samples for HAdV and 4% (2) for NoV. Of all fecal samples investigated in this period, in only one RV was diagnosed by enzymatic immunoassay assay. Thus, it was observed that the viral GA was associated with 19% (10) of acute diarrhea from samples tested. The human astrovirus detection has not been carried out since the previous analysis of the available primers showed no conclusive results, opting for the design and synthesis of new primers, which is underway. Coinfections were not observed. Of infected patients, 80% were children of which 40 % were younger than 2 years. The standardization of a more specific and sensitive diagnostic technique such as PCR showed that despite the cases reduction of RV gastroenteritis, the GA caused by other viral etiological agents are significant, especially among pediatric patients.

Keyword: gastroenteritis, human adenovirus, norovirus, astrovirus, PCR

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	08
2	REVISÃO DE LITERATURA	09
2.1	GASTRONTERITE AGUDA	09
2.2	ADENOVÍRUS	10
2.3	NOROVÍRUS	11
2.4	ASTROVÍRUS	12
3	JUSTIFICATIVA	13
4	OBJETIVO	14
4.1	OBJETIVO GERAL	14
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
5	MATERIAL E MÉTODOS	15
5.1	TIPO DE ESTUDO	15
5.2	DESENHO EXPERIMENTAL	15
5.3	AMOSTRAS CLÍNICAS	15
5.4	PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	17
5.5	EXTRAÇÃO DO GENOMA VIRAL	17
5.6	OBTENÇÃO DO DNA COMPLEMENTAR (cDNA)	18
5.7	AMPLIFICAÇÃO DO MATERIAL GENÉTICO VIRAL	18
5.8	PURIFICAÇÃO DO PRODUTO DA AMPLIFICAÇÃO	20
5.9	CLONAGEM DE PRODUTO DE PCR EM SISTEMA PROCARIONTE	21
5.9.1	Reação de ligação	21
5.9.2	Transformação em bactérias competentes	23
5.9.3	Placa mãe (<i>master plate</i>)	23
5.9.4	PCR de colônia	24
5.9.5	Inóculo de clones positivos	24
5.9.6	Purificação (miniprep) de DNA plasmidial	24
6	RESULTADOS	26
6.1	PADRONIZAÇÃO DA TERMOCICLAGEM	26
6.2	PADRONIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DO GENOMA VIRAL	27
6.3	VALIDAÇÃO DO PROTOCOLO DE PCR SIMULTÂNEO	27

6.4	CLONAGEM DOS PRODUTOS DOS CONTROLES POSITIVOS.....	29
6.5	INVESTIGAÇÃO VIRAL NAS AMOSTRAS CLÍNICAS	30
6.6	CARACTERIZAÇÃO DEMOGRÁFICA.....	31
7	DISCUSSÃO.....	33
8	CONCLUSÕES.....	38
9	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	39
	REFERÊNCIAS.....	40

1 INTRODUÇÃO

As gastroenterites agudas (GA) são um dos maiores problemas de saúde enfrentados pelos países em desenvolvimento. Consideradas um problema de saúde pública, infecções entéricas que causam diarreia são responsáveis por altas taxas de morbidade e mortalidade, principalmente entre crianças, mas também em idosos. Mundialmente, a diarreia é a segunda maior causa de morte entre crianças menores de 5 anos, responsável por cerca de 1,5 milhões de mortes por ano, representando 16% dos óbitos neste grupo (BOSCHI-PINTO *et al.*, 2008; BLACK *et al.*, 2010; WARDLAW *et al.*, 2010).

Além do impacto significativo sobre a saúde coletiva, quadros de diarreia são responsáveis por perdas econômicas substanciais devido às intervenções necessárias ao tratamento e controle da doença, às hospitalizações e ao tempo despendido dos familiares durante o tratamento dos pacientes (MARTINES *et al.*, 1991).

A etiologia das diarreias é bastante complexa e pode envolver diferentes agentes. Estudos indicam que, tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento, a maioria dos casos de gastroenterite é de causa viral, das quais os principais agentes são: adenovírus, astrovírus, norovírus e rotavírus (MORAES & CASTRO, 2014). A investigação laboratorial sistemática da presença destes vírus em pacientes hospitalizados por GA tem profundo impacto, permitindo conhecer a prevalência destas infecções na população, consequentemente guiando a introdução de medidas preventivas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 GASTRONTERITE AGUDA

Gastroenterites agudas são definidas como uma inflamação aguda que compromete os órgãos do sistema gastrointestinal causando como principal sintoma quadros de diarreia aguda – caracterizada por fezes líquidas, além do aumento do número de evacuações, que durem menos de 14 dias. Embora a maioria dos episódios de diarreia sejam suaves, os casos agudos podem levar à perda de líquido significativo e desidratação, o que pode resultar em morte ou outras consequências graves se os fluidos não forem repostos no primeiro sinal de diarreia (WGO, 2014).

A prevalência estimada dessa inflamação é de 3 a 5 bilhões de casos por ano no mundo. Anualmente, cerca de 2,5 bilhões de casos de diarreia ocorrem entre crianças menores de cinco anos de idade. A incidência de doenças diarreicas varia muito com as estações do ano e a idade da criança. Quanto mais jovens, mais vulneráveis - a incidência é maior nos dois primeiros anos de vida e diminui à medida que a criança cresce. A diarreia é a segunda causa mais comum de mortes infantis no mundo, 16%. (WARDLAW *et al.*, 2010) (FIGURA 1).

No Brasil, GA representa uma das principais causas de morbidade e mortalidade no primeiro ano de vida. Em 2006, casos de diarreia aguda foram responsáveis por cerca de 120.000 internações de crianças menores de cinco anos (RIPSA, 2008).

As gastroenterites também afetam adultos e idosos, sendo responsáveis por uma relevante taxa de morbidade nestes últimos. É também uma das principais causas de morte durante emergências complexas e desastres naturais. O deslocamento de populações em abrigos superlotados temporários é frequentemente associado com fontes poluídas de água, saneamento inadequado, práticas precárias de higiene, alimentos contaminados e desnutrição - todos os quais afetam a propagação e gravidade da diarreia. Ao mesmo tempo, a falta de serviços de saúde adequados e transporte reduz a probabilidade de um tratamento rápido e adequado dos casos de diarreia (WARDLAW *et al.*, 2010).

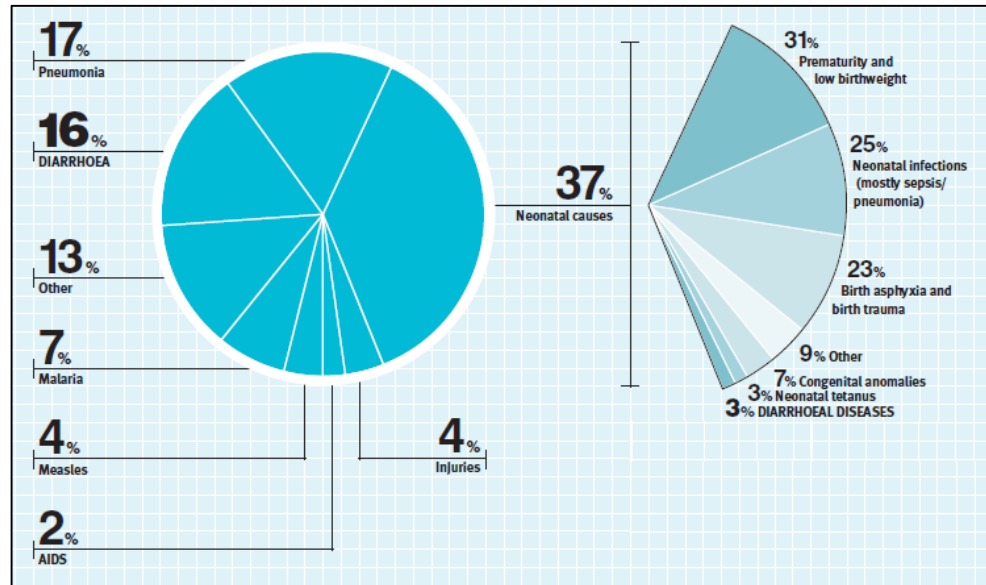


FIGURA 1 - DISTRIBUIÇÃO PROPORCIONAL MUNDIAL DE MORTES POR CAUSAS ESPECÍFICAS ENTRE AS CRIANÇAS MENORES DE CINCO ANOS DE IDADE EM DE 2008.
FONTE: WHO, 2008.

A etiologia das diarreias infecciosas é bastante complexa e pode envolver diferentes agentes como vírus, bactérias, parasitas e também toxinas. A importância dos agentes etiológicos é variável e o predomínio de um agente ou sua distribuição sazonal está diretamente relacionado com a frequência e intensidade com que medidas higiênico-sanitárias são adotadas (BERN & GLASS, 1994; CICIRELLO & GLASS, 1994; MORAES & CASTRO, 2014).

Os vírus são reconhecidos como importantes causadores de gastroenterites, principalmente em crianças. Estudos indicam que, tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento, um grande número de casos de diarreia têm sido atribuídos à etiologia viral, sendo estimado que, nos países desenvolvidos, cerca de 70-80% das gastroenterites em crianças sejam por essa etiologia (DOMÍNGUEZ *et al.*, 2009).

2.2 ADENOVÍRUS

O adenovírus humano (HAdV) é um vírus DNA, não envelopado, icosaédrico, pertencente à família *Adenoviridae*. Está associado a um largo espectro de manifestações clínicas – respiratório, gastrointestinal, intra-ocular, neurológico e infecções do trato urinário. Esta família compreende 55 diferentes sorotipos (HAdv 1-55) agrupados em sete subgêneros (A-G), das quais os sorotipos 40, 41 e mais

raramente, 38 estão relacionadas com diarreia aguda (WOLD & HORWITZ, 2007; RAMANI & KANG, 2009; WALSH *et al.*, 2010).

Estes vírus afetam principalmente crianças menores de dois anos, de forma que sua frequência como causa de GA só eram superadas pelo rotavírus, até a introdução da imunização contra Rotavírus A (VAN *et al.*, 1992). A frequência de GA por HAdVs 40 e 41 identificadas em crianças não imunossuprimidas varia entre 0,7% e 31,5%. Deve-se considerar que existem subnotificações devido a diagnósticos falsos negativos decorrentes da sensibilidade das técnicas convencionais (DOMÍNGUEZ *et al.*, 2009).

2.3 NOROVÍRUS

Norovírus (NoV) são um vasto grupo de vírus geneticamente relacionados que pertencem à família *Caliciviridae*. Norovírus humanos não podem ser isolados por cultivo celular. São vírus não envelopados, icosaédricos, cujo genoma é constituído de RNA de fita simples, de polaridade positiva, organizado em três sequências de leitura abertas (ORF - *Open read frame*), ORF1, ORF2 e ORF3. Apresentam uma elevada diversidade genética, sendo classificados em cinco genogrupos (GI-GV), os quais são subdivididos em mais de 30 genótipos. Apenas os grupos GI (8 genótipos), GII (19 genótipos) e GIV têm sido associados a infeções humanas. Os grupos restantes têm sido encontrados apenas em animais (EDEN *et al.*, 2013)

A transmissão deste vírus entérico é fecal-oral, quer por ingestão de água e alimentos contaminados, quer por contato direto pessoa-a-pessoa. Constituem também importantes fontes de contaminação, o contato da mucosa oral com os aerossóis formados durante o vômito e o contato com superfícies contaminadas com material fecal ou vômito. NoV é um dos agentes mais frequentes da infecção gastrointestinal aguda, afetando todos os grupos etários. É reconhecido como o maior causador de GA não bacteriana em todas as idades em países desenvolvidos – estima-se que seja responsável por 18% de todos casos de gastroenterites - e está associado também com a maioria dos surtos de origem alimentar (DEBBINK *et al.*, 2012).

Infecções por norovírus são processos autolimitados, geralmente desaparecem dentro de 48 horas, embora deva ser observado que em pessoas com

doenças subjacentes, tais como pacientes hospitalizados ou idosos, a manifestação clínica pode ser muito mais grave (renal e envolvimento cardíaco) e durável, sendo descrito que várias manifestações sistêmicas (dor de cabeça, tontura, anorexia ou letargia) podem persistir por tempos mais prolongados (DOMÍNGUEZ *et al.*, 2009).

2.4 ASTROVÍRUS

Os astrovírus pertencem à família *Astroviridae*, que é dividida em dois gêneros: *Mamastrovirus* e *Avastrovirus*. O gênero *Mamastrovirus* inclui os oito tipos de astrovírus humanos e aqueles que acometem suínos, felinos, caninos, bovinos e ovinos. São vírus esféricos, não envelopados e icosaédricos. Possuem um genoma RNA fita simples de polaridade positiva que inclui três regiões de leitura aberta – *Open Reading Frame*, ORF – (ORF1a, ORF1b e ORF2) (SANTOS & CARDOSO, 2005).

Os astrovírus são enteropatógenos de distribuição mundial, os quais, depois dos rotavírus, são reconhecidos como a segunda causa mais comum de gastroenterite viral em bebês e crianças jovens hospitalizadas. Geralmente, a faixa etária em que mais se observa infecção por este agente viral são os menores de 5 anos de idade. Estudos de soroprevalência também têm demonstrado que até 90% das crianças nesta faixa etária já foram infectadas por este enteropatógeno (MITCHELL, 2002). Poucos estudos sobre astrovírus têm sido realizados no Brasil, onde se observam índices de detecção viral que variam de 2% a 5% (SILVA *et al.*, 2001).

A transmissão de astrovírus ocorre pela rota fecal-oral, por água e alimentos contaminados. O período de incubação varia de um a quatro dias. A enfermidade causada pelos vírus tende a ser leve e autolimitada e geralmente não resulta em significativo quadro de desidratação ou na necessidade de hospitalização.

3 JUSTIFICATIVA

As gastroenterites agudas são responsáveis por altas taxas de morbidade e mortalidade infantil. É uma doença de grande impacto em países em desenvolvimento e, ao contrário do que se imagina, não se restringe apenas a estas regiões, possui distribuição mundial, sendo responsável também por 10% das hospitalizações de crianças menores que cinco anos em países desenvolvidos (DOMÍNGUEZ *et al.*, 2009).

Dentre os diversos agentes etiológicos, os vírus são os principais causadores das gastroenterites agudas, destes os de maior relevância são: rotavírus, adenovírus, norovírus e astrovírus (SANTOS *et al.*, 2007). Com a introdução da vacina para rotavírus, após 2006 observou-se uma queda expressiva na circulação deste vírus na comunidade atendida pelo HC – UFPR (PEREIRA *et al.*, 2011). Em contrapartida, houve um aumento na ocorrência de infecções por adenovírus e norovírus, sendo de se esperar um aumento em escala de outros vírus entéricos na etiologia das GA (RABONI *et al.*, 2014).

Desta maneira, a investigação laboratorial mais precisa dos agentes etiológicos das gastroenterites e uma melhor vigilância epidemiológica se fazem necessárias para orientar a prevenção, as medidas terapêuticas e o controle de surtos.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver protocolo de detecção simultânea de adenovírus, norovírus e astrovírus em amostras fecais utilizando metodologia de biologia molecular.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronização da extração do genoma viral e amplificação utilizando PCR *nested* para adenovírus e RT-PCR para norovírus e astrovírus.
- Clonar em sistema procarionte os controles positivos de adenovírus, norovírus e astrovírus.
- Identificar a frequência de infecções por HAdV, HAdV e NoV nas amostras clínicas fecais nos meses de janeiro a outubro do ano de 2014 armazenadas no Laboratório de Virologia HC-UFPR.
- Caracterizar demograficamente a população diagnosticada com gastroenterite viral nos meses de janeiro a outubro do ano de 2014 no Hospital de Clínicas – UFPR.

5 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo possui aprovação no Comitê de Ética, CAAE 0221.0.208.000-10, do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR.

5.1 TIPO DE ESTUDO

Trata-se de um estudo descritivo, observacional, transversal, com duração de 10 meses, iniciado em fevereiro de 2014 e concluído em dezembro de 2014.

5.2 DESENHO EXPERIMENTAL

O trabalho foi desenvolvido em três etapas. A primeira etapa referente à padronização da PCR simultânea para adenovírus, norovírus e astrovírus. A segunda etapa, referente à clonagem dos produtos de PCR obtidos das amostras de fezes positivas de cada vírus. A terceira etapa referente à investigação desses três vírus em amostras clínicas fecais do ano de 2014 armazenadas no Laboratório de Virologia HC-UFPR.

Todas as etapas tiveram em comum as fases de processamento das fezes até a amplificação do material genético viral. A etapa de clonagem foi a única que exigiu ensaios subsequentes à eletroforese, como está ilustrado no fluxograma de atividades (FIGURA 2).

5.3 AMOSTRAS CLÍNICAS

A padronização do PCR simultâneo foi realizada com a obtenção de uma amostra positiva para adenovírus - amostra de urina 619/14 que foi diagnosticada positiva para adenovírus e poliovírus BK na rotina do laboratório de Virologia HC-UFPR.

Como controle positivo, duas amostras fecais (uma adenovirus positiva e uma astrovirus positiva) foram cedidas pelo Laboratório Central do Paraná (Lacen/PR). Para norovirus utilizou-se a amostra de fezes 2798/05 que se encontrava armazenada no Laboratório Virologia HC/UFPR.

Das 101 amostras fecais enviadas ao Laboratório de Virologia HC-UFPR para a investigação de gastroenterite por rotavírus, no período de janeiro à novembro de 2014, foram selecionadas 51 amostras para o desenvolvimento deste estudo – pois apenas estas atendiam o critério de inclusão de serem fezes diarreicas. De todas, apenas uma amostra era positiva para rotavírus.

Critério de inclusão: fezes diarreicas. Critério de exclusão: fezes não diarreicas.

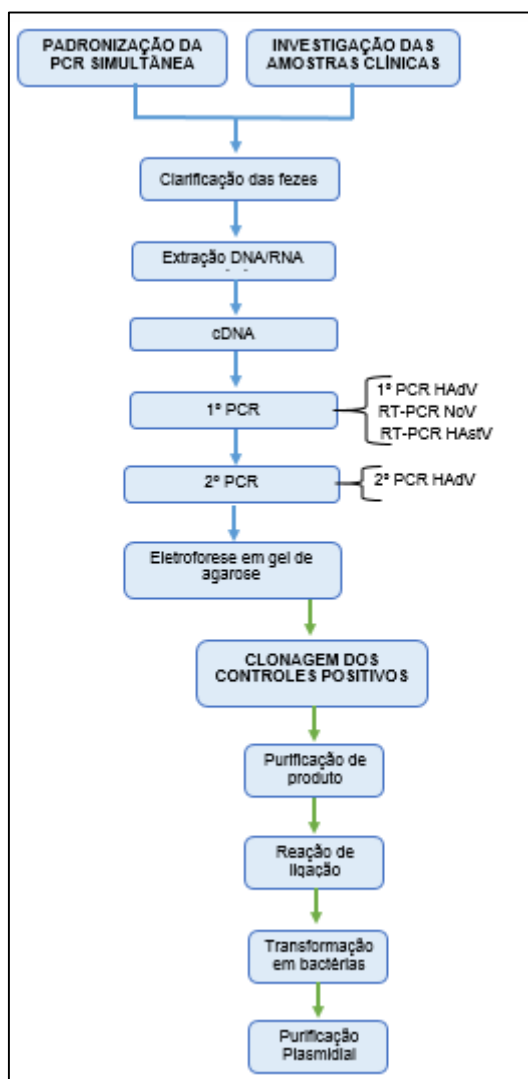


FIGURA 2 – FLUXOGRAMA DE ATIVIDADES.

5.4 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

As suspensões para extração genômica foram preparadas pela diluição do material fecal a 10% em tampão Tris-HCl (0.01 M)-CaCl₂ (0.0015 M) seguida de homogeneização e clarificação a 2000 g por 15 min a 4°C.

5.5 EXTRAÇÃO DO GENOMA VIRAL

O DNA/RNA viral foi extraído a partir de 200µL da suspensão fecal processada utilizando o kit Purelink Viral RNA/DNA® (Invitrogen, Inc) de acordo as orientações do fabricante. Um plasmídeo contendo fragmento de pseudorabies vírus (PRV) – vírus suíno pertencente à subfamília *Herpesviridae* – foi adicionado ao tampão de lise à concentração de 1.74×10^{-8} ng/µL utilizado como controle interno de reação.

O kit utilizado baseia-se na tecnologia de extração e purificação por afinidade. As colunas contêm resina de sílica que promove a ligação seletiva de DNA/RNA dependendo da concentração de sal e outros fatores que são influenciados pelo método de extração. A extração do RNA é potencializada pelo uso de um carreador – tRNA de levedura que tem a função de aumentar a ligação de ácidos nucleicos virais com a matriz de sílica e reduzir a degradação do ácido nucleico viral por nucleases presentes na amostra.

A lise da amostra se dá através do uso de um tampão de lise – que contém alta concentração de sais detergentes que ao quebrar ligações de hidrogênio, interações de *Van der Waals* e interações hidrofóbicas proporciona condições para a membrana de ligação de sílica, em adição utiliza Proteinase K protease com função desnaturante. A precipitação é feita por redução de constante dielétrica causada pelo etanol absoluto à 37% na concentração final. Os ácidos nucleicos são absorvidos na sílica, enquanto a maioria das outras moléculas passam através da coluna. A purificação do material é realizada por lavagens da coluna de sílica com tampão específico para a retirada de material orgânico como proteínas e nucleases que podem também se ligar inespecificamente à coluna. O RNA então é eluído em água livre de RNase.

A dosagem do material extraído foi realizada em espectrofotômetro Thermo Scientific NanoDrop 2000c utilizando 1µL do extraído para o parâmetro dsDNA e 1µL para RNA, considerada a leitura da relação de absorbância A260/280 entre 1,9 e 2,1 uma extração com alto nível de pureza oligonucleica.

5.6 OBTENÇÃO DO DNA COMPLEMENTAR (cDNA)

Dois dos três vírus investigados (NoV e HAdV) são vírus RNA de simples fita; portanto, após a fase de extração todos os extraídos passaram pela etapa de síntese de DNA complementar (cDNA).

A transcrição reversa foi realizada utilizando oligonucleotídeos hexâmeros PdN₆ e a enzima transcriptase reversa SuperScript III® (Invitrogen Inc, USA). Desta forma obteve-se o cDNA adicionando 1µL dos oligonucleotídeos hexâmeros (0,2µg/µL Invitrogen Inc) e 3µL de água ultra pura à 8µL de RNA, incubando a 80°C por 3 min. Em seguida foi adicionado 4µL de tampão de RT (5X), 2µL de 0.1M MDTT (Invitrogen™), 2µL de deoxinucleotídeo trifosfatados (dNTPS) (10mM cada), 1µL de inibidor de RNase OUT™ (20U/µL, Invitroge, Inc) e 1µL da enzima transcriptase reversa SuperScript III® (200U/µL, Invitroge, Inc) com uma incubação subsequente de 37°C por 90 min e 94°C por 2 min.

5.7 AMPLIFICAÇÃO DO MATERIAL GENÉTICO VIRAL

Além do protocolo de PCR padronizado neste estudo, utilizou-se também no processo de validação da técnica o protocolo do kit comercial Seeplex® Diarrhea ACE Detection (Seegene Inc).

O ensaio padronizado neste estudo trata-se da execução simultânea de um *nested* PCR para a investigação de HAdV e duas RT-PCR, uma para a investigação de NoV e outra para HAdV. Uma vez que foi utilizado o plasmídeo de PRV como controle externo de reação, a PCR *nested* se trata de ensaio *duplex*, contendo tanto iniciadores para o alvo viral quanto para o PRV.

Para a detecção de HAdV foram utilizados iniciadores genéricos para a região hexon de adenovírus (AVELLÓN *et al.*, 2001). Para o NoV utilizou-se iniciadores para

RNA polimerase (VINJÉ & KOOPMANS, 1996) e para HAdV utilizou-se iniciadores para ORF2 de acordo com Noel *et al.* (1995). Os iniciadores do PRV foram descritos por Pozo e Tenorio (1999) e amplificam a região da DNA polimerase deste vírus. As sequências dos iniciadores assim como o tamanho dos respectivos produtos estão descritos no QUADRO 1.

Para a reação de amplificação utilizou-se 2,5µL de cDNA em 12,5µL de GoTaq® Collor Less Master Mix (Promega Inc) – solução contendo Taq DNA polimerase, dNTPs, MgCl₂, tampão – e 9µL de água livre de DNA/RNase. A amplificação foi realizada no termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycler (AB Applied Biosystems, Inc) programado nas condições de ciclagem: 94°C por 1 min seguido de 40 ciclos de 94°C por 1min, 50°C por 1min, 72°C por 1min seguido do passo de extensão à 72°C por 6min. Para o segundo PCR para HAdV repete-se o protocolo, utilizando 1,5 do produto do 1º PCR e acrescentando 1µL de água livre de DNA/RNase. Os produtos de PCR foram verificados em eletroforese de gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo (0,5 ug/mL). Os géis foram fotografados em transiluminador sob luz ultra violeta e as bandas analisadas usando o programa E-Capt (Versão 12.7, Vilber Lourmat).

Iniciadores	Sequência 5'- 3'	Gene alvo	Produto
ADHEX 2F	CCCMTTYAACCACCACCG	Hexon HAdV	169pb
ADHEX 1R	ACATCCTTB CKGAAGTTCCA		
ADHEX 2R	KATGGGGTARAGCATGTT		
ADHEX 1F	AACACCTAYGASTACATGAAC		
JV12	ATACCACTATGATGCAGATTA	RNA polimerase	430pb
JV13	TCATCATCACCATAGAAAGAG	NoV	
Mon 270F	CAACTCAGGAAACAGGGTGT	ORF2 HAdV	449pb
Mon 269R	TCAGATGCATTGTCATTGGT		
PRV 1+	CGCGTGGTCTACGGGGACACGGA	DNA polimerase PRV	190pb
PRV 1-	ATGACGCCGATGTACTTCTTCTT		
PRV 2+	GGGACACGGACTCGGTCTCC		140pb
PRV 2-	CCGGAAGGTCTTCTCGCACTC		

QUADRO 1 – SEQUÊNCIA DOS INICIADORES UTILIZADOS NA PCR *NESTED* E NA RT-PCR PARA DETECÇÃO DE ADENOVÍRUS, NOROVÍRUS, ASTROVÍRUS, PRV.

FONTE: AVELLÓN *ET AL.* (2001), VINJÉ & KOOPMANS (1996), NOEL *ET AL.* (1995), POZO & TENORIO (1999).

O kit comercial Seeplex® Diarrhea-V ACE Detection (Seegene Inc) é um sistema de PCR *multiplex* para a detecção de gastroenterites virais causadas por:

astrovírus, rotavírus A (RVA), adenovírus entérico, norovírus (GI/GII). Foi realizado protocolo seguindo as instruções da bula.

Os produtos de PCR foram verificados em eletroforese de gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL). Os géis foram fotografados em transiluminador sob luz ultra violeta e analisados usando o programa E-Capt (Versão 12.7, Vilber Lourmat). Amplificação gerando banda de 1000pb refere-se ao controle interno de reação, de 650 a astrovírus, 541 a rotavírus A, 411 a adenovírus entérico, 304 a NoV-GI e 214 a NoV-GII. Devido a reação cruzada, um resultado positivo de NoV-GII pode se tratar de um NoV-GIV.

5.8 PURIFICAÇÃO DO PRODUTO DA AMPLIFICAÇÃO

A fim de obter um produto de alta qualidade para prosseguir à fase de clonagem, os produtos de PCR dos controles positivos foram purificados utilizando o kit PureLink® Quick Gel Extratction (Invitrogen Inc) de acordo com instruções da bula.

O produto da PCR de astrovírus foi purificado a partir do gel de agarose, pois apenas obteve-se sucesso na amplificação deste fragmento ao utilizar o kit comercial da Seegene que possui um controle interno de reação produzindo um produto de 1000pb além do produto do alvo. Desta forma, após a eletroforese, a banda específica de 650pb foi recortada do gel e transferida para um tubo cônico de 1,5 mL. Em seguida, o material foi pesado e foi adicionado tampão de solubilização de gel na proporção de 3 mL tampão para 1 mg de gel (indicado para géis de agarose ≤ 2%). O tubo foi incubado a 50°C por 10 min, até que o gel estivesse completamente dissolvido e então seguiu-se às etapas de purificação que são iguais para as amostras purificadas direto da reação de final de PCR.

A purificação com o kit PureLink® Quick Gel Extraction (Invitrogen Inc), assim como a técnica de extração de genoma anteriormente utilizada, se baseia na afinidade DNA/sílica. As colunas contêm resina de sílica que promove a ligação seletiva de DNA, em seguida é feita a etapa de lavagem com tampão à base de etanol para a retirada de material orgânico como proteínas e nucleases que podem também se ligar inespecificamente à coluna e por fim a eluição é feita com tampão de eluição do kit.

A dosagem do material purificado foi realizada em espectrofotômetro Thermo Scientific NanoDrop 2000c utilizando 1 µL do purificado no parâmetro dsDNA,

considerada a leitura da relação de absorbância A_{260/280} entre 1,9 e 2,1 um material com alto nível de pureza oligonucleica.

5.9 CLONAGEM DE PRODUTO DE PCR EM SISTEMA PROCARIONTE

A fim de produzir controles positivos em larga escala para utilização no PCR de detecção de HAstV, HAdV e NoV, os fragmentos amplificados e purificados destes vírus foram clonados em sistema procarionte utilizando o vetor plasmidial pGEM®- T Easy (Promega Inc).

Plasmídeos são moléculas de DNA fita dupla extracromossomal encontrados em todas as espécies de bactérias. O vetor pGEM®- T Easy já se encontra linearizado devido à preparação por meio da digestão com a enzima EcoRV e adição de uma timina em cada 3' terminal.

Todos os plasmídeos contêm três características comuns: marca seletiva, origem de replicação e sítio múltiplo de clonagem. A marca seletiva refere-se a genes que conferem resistência a antibióticos e que proporcionam a seleção dos clones transformados daqueles não transformados. O vetor utilizado possui gene de resistência à ampicilina, logo, este antibiótico foi adicionado ao meio de cultivo na concentração de 100 µg/µL; permitindo, assim, diferenciar unidades formadoras de colônias (UFC) transformadas - as resistentes ao antibiótico.

A origem de replicação é o sítio em que se inicia a replicação do DNA. Plasmídeos de alta cópia, como o vetor utilizado neste trabalho, possuem origem de replicação independente (ori) o que permite que o vetor se replique independentemente da replicação bacteriana, produzindo milhares de cópias do plasmídeo dentro da célula hospedeira.

O sítio múltiplo de clonagem é um sítio de clivagem de enzimas de restrição no qual é inserido o fragmento de DNA de interesse (inserto) podendo ou não interferir na funcionalidade do plasmídeo. O vetor pGEM®- T Easy possui sítios múltiplos de clonagem no gene da enzima β-galactosidase (lac z), a clonagem do inserto interrompe o gene que codifica para β-galactosidase. Uma β-galactosidase bacteriana não funcional na presença de meio IPTG/X-Gal tem como expressão fenotípica de colônias brancas, o que possibilita a seleção de colônias clonais. A representação esquemática do vetor pGEM®- T Easy encontra-se ilustrado na FIGURA 3.

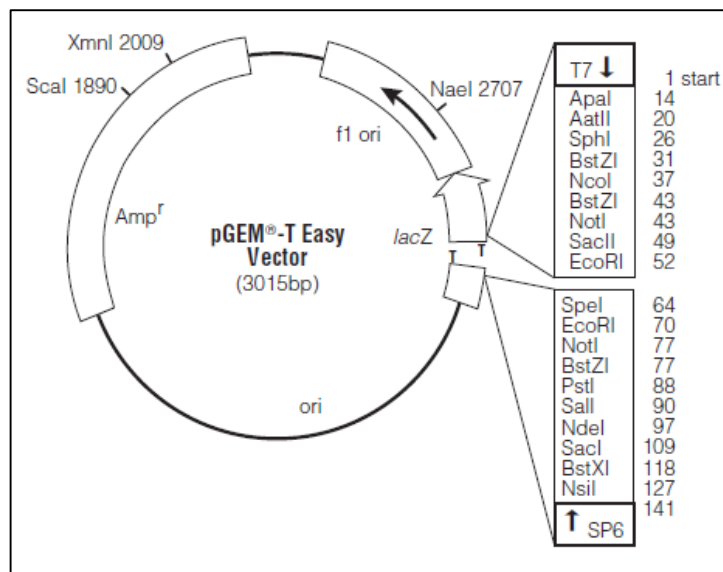


FIGURA 3 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PLASMÍDEO pGEM®- T Easy.
FONTE: PROMEGA, 2010.

5.9.1 Reação de ligação

Durante a PCR, a Taq DNA polimerase adiciona um resíduo de deoxiadenosina (A) à extremidade 3' das fitas de DNA do fragmento amplificado. Essa adenina protuberante permite ligar o fragmento de DNA a vetores específicos que contém resíduo de deoxitimidina (T) protuberante na extremidade 3'. Desta forma, os fragmentos de DNA oriundos da reação de PCR são misturados ao vetor linearizado juntamente com a enzima T4 DNA ligase, a qual permite a ligação entre eles, gerando uma molécula de DNA plasmidial que contém o fragmento de interesse. (NASCIMENTO *et al.*, 1999).

A reação de ligação acontece adicionando em um tubo cônico de 1,5 mL 5 µL de tampão 2X Rapid Ligation, T4 DNA Ligase, 1 µL do vetor pGEM®- T Easy (50ng), 1 µL de T4 DNA Ligase (3U/µL), X µL de produto de PCR (de acordo proporção 3ng inserto para 1ng de vetor, calculada pela fórmula ilustrada na FIGURA 4) e água ultra pura para completar volume final de 10 µL. Após incubação a 4°C por 16 horas, os vetores são transferidos para bactérias competentes (transformação de bactérias competentes).

$$\frac{\text{ng of vector} \times \text{kb size of insert}}{\text{kb size of vector}} \times \text{insert:vector molar ratio} = \text{ng of insert}$$

FIGURA 4 – CÁLCULO DE QUANTIDADE DE INSERTO PARA REAÇÃO DE LIGAÇÃO.
FONTE: PROMEGA, 2010.

5.9.2 Transformação em bactérias competentes

Bactérias *Escherichia coli* são as células mais comumente utilizadas para transformação. Há duas formas de transformar essas células: eletroporação e choque térmico, sendo esta última a utilizada no presente estudo. O choque térmico é um método de transformação fácil e relativamente barato. Consiste na preparação das bactérias para torná-las competentes por meio de tratamento com cloreto de cálcio. Os íons atuam neutralizando as cargas negativas da membrana e do DNA. Após um choque térmico à temperatura de 42° C, criam-se poros na membrana e o plasmídeo pode alcançar o interior da célula.

A transformação se dá pela adição da reação de ligação à cultura congelada de linhagem de *E. coli* TOP10® termocompetentes (Invitrogen Inc), seguido de incubação no gelo por 30 min, incubação a 42° C por 2 min e outros 2 min incubando no gelo. Após o choque térmico, adiciona-se 900 µL de meio Luria-Bertani (LB) (triptona 1%; extrato de levedura 0,5%; NaCl 1%, peso/volume) às bactérias seguido de incubação a 37° C em agitação constante por 1 hora a 120 rpm para a recuperação das células.

Ao final da incubação foram pipetadas 100 µL e 50 µL da solução em placas contendo meio LB sólido suplementado com 100µg/mL de ampicilina, 0,4mM de IPTG (Isopropil-b-D-tiogalactopirosídeo) e 0,04mg/mL de X-Gal (bromo-chloro-indolyl-galactopyranosídeo). A amostra foi espalhada e uniformizada sobre a superfície do ágar com alça de drigalski até o momento em que não mais se verificou indícios de líquido. Por último as placas foram incubadas a 37° C, por 16 horas.

5.9.3 Placa mãe (*master plate*)

Para facilitar a identificação de possíveis clones, as colônias brancas obtidas na transformação de ligações com sistema pGEM-T Easy são repicadas em uma nova

placa (placa mãe) – meio LB sólido, ampicilina/IPTG/X-Gal -, que contem quadrantes numerados para a identificação de cada colônia.

Em um ambiente estéril, utilizando palitos de dente autoclavados, foram pescadas as colônias brancas da placa em que as bactérias foram transformadas e transplantadas para a placa mãe no centro de um dos seus quadrantes. A placa foi incubada a 37°C por 16 horas.

5.9.4 PCR de colônia

Para detectar a presença de clones foi utilizada a técnica de PCR de colônia. Foram transplantadas, com uma ponteira, 5 colônias da placa mãe e transferidas para tubos cônicos 1,5 mL e adicionou-se 20 µL de água ultra pura. Após agitar em vortex por 15 segundos os tubos foram incubados a 90° C por 5 minutos.

Após esse processamento, foi efetuada a PCR do sobrenadante utilizando o mesmo protocolo de amplificação anteriormente descrito para obtenção do produto que está sendo clonado.

5.9.5 Inóculo de clones positivos

Uma vez confirmada por PCR a existência de clones positivos, retornou-se à placa mãe e, em um ambiente estéril, foram pescadas com palitos de dente autoclavados as colônias referentes às selecionadas pela PCR de colônia. Estas foram inoculadas em tubo cônico com capacidade para 15 mL contendo 3mL de meio líquido LB e 100 µg/mL de ampicilina, identificando-os com os respectivos números da placa mãe. Os inóculos foram incubados a 37° C em agitação constante de 200 rpm, por 16 horas.

5.9.6 Purificação (*miniprep*) de DNA plasmidial

O isolamento de DNA plasmidial é um procedimento fundamental para a clonagem molecular. No caso das bactérias Gram negativas (*E. coli*), a combinação de detergentes e substâncias alcalinas removem as camadas lipídicas da membrana

externa e da parede celular expondo o DNA para a purificação. As proteínas podem ser removidas eficientemente com a utilização de uma mistura dos solventes orgânicos. Esses solventes atuam como agentes desproteinizantes, rompendo rapidamente a integridade celular e desnaturando as proteínas, deixando os ácidos nucleicos em solução aquosa. As etapas de purificação resumem-se em recuperação das células do inóculo por centrifugação e resgate de *pellet*; lise das células, formando um extrato celular; tratamento e purificação do extrato celular, lavagem e resgate do DNA em solução.

A purificação foi realizada com o kit Plasmid DNA Purification, NucleoSpin® Plasmid (MACHEREY-NAGEL). Para uma melhor eficiência da recuperação do DNA plasmidial, dentre os protocolos sugeridos pelo fabricante, utilizou-se o descrito a seguir.

Após a incubação por um período de 16 horas do inóculo de clones positivos, foram centrifugados os 3 mL do cultivo de *E. coli* em LB em tubo cônico 1,5 mL a 11.000 *g* por 30 seg, descartando o sobrenadante e removendo o máximo possível de líquido em torno do *pellet* formado. Em seguida, para a etapa de lise, o *pellet* foi ressuspenso com 500 µL do tampão A1, seguido de homogeneização em vortex, e da adição de 500 µL de tampão A2, homogeneizando gentilmente por inversão para em seguida incubar à temperatura ambiente por 5min. Passado o período de incubação foi adicionado 600 µL do tampão 3, homogeneizado por inversão e então para clarificação, o lisado foi centrifugado a 11.000 *g* por 10 min. O sobrenadante foi transferido para coluna e centrifugado novamente a 11.000 *g* por 1 minuto, para que houvesse a ligação do DNA à coluna. Descartou-se o líquido no tubo coletor e se iniciou a etapa de lavagem por meio da adição de 500 µL do tampão AW pré-aquecido a 50° C e subsequente centrifugação a 11.000 *g* por 1 min. Descartou-se novamente o líquido do tubo coletor, foram adicionados 600 µL de tampão A4 e centrifugado a 11.000 *g* por 1 min. Para secar a coluna, o líquido proveniente da lavagem foi descartado e a coluna centrifugada a 11.000 *g* por 2 min. A eluição do DNA foi realizada com 50 µL de tampão AE pré-aquecido a 70° C e incubado por 2 minutos a 70° C, em seguida a coluna foi centrifugada a 11.000 *g* por 1min e o produto da purificação plasmidial foi armazenada a -20° C.

O material purificado foi dosado em espectofotômetro Thermo Scientific NanoDrop 2000c e submetido a eletroforese em gel de agarose de 2% corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL).

6 RESULTADOS

6.1 PADRONIZAÇÃO DA TERMOCICLAGEM

A fim de desenvolver protocolo de PCR único para detecção simultânea de HAdV, NoV e HAdV, a amostra de urina (619/14) HAdV positiva foi submetida a PCR *nested* em gradiente de temperatura de anelamento: 48°C, 50°C, 52°C, 54°C, 56°C. A amplificação do gene da β -globina, como controle de extração, também foi realizada no mesmo gradiente. Conforme ilustrado na FIGURA 5 observou-se produtos no 2º PCR de HAdV em todas temperaturas testadas. Apesar de não ilustrada o gene da β -globina também foi amplificado em todas as temperaturas do gradiente – na foto, apenas ilustrada a banda referente a 50°C.

Para a otimização do protocolo simultâneo, buscou-se a detecção do HAdV sem a realização de um PCR *nested*. Para tal, foi realizado PCR dobrando a quantidade de DNA extraído utilizado na 1ª reação de amplificação (2,5µL para 5µL). Ainda assim não se obteve visualização de bandas no gel do 1º PCR de HAdV, o que já era esperado, pois não há registros da detecção de HAdV em um único PCR em outros trabalhos que utilizem os mesmos iniciadores.

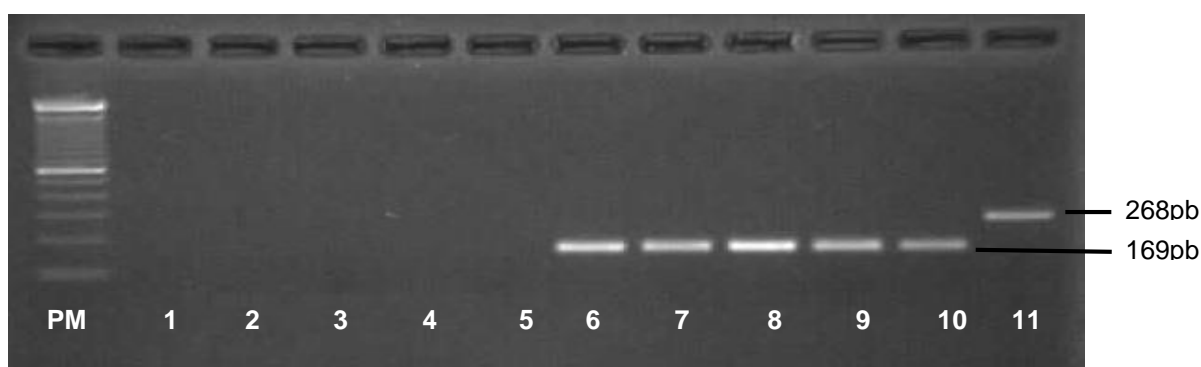


FIGURA 5 – ELETROFORESE DE GEL DE AGAROSE 2% DO PRODUTO DA PCR EM GRADIENTE DE AMOSTRA ADENOVÍRUS POSITIVA 619/14. LEGENDA: PM – PESO MOLECULAR 100PB; 1 - PCR1 48°C; 2 – PCR1 50°C; 3 – PCR1 52°C; 4 – PCR1 54°C; 5 – PCR1 56°C; 6 – PCR2 48°C; 7 – PCR2 50°C; 8 – PCR2 52°C; 9 – PCR2 54°C; 10 – PCR 56°C; 11 – BETA B-GLOBINA PCR 50°C. FONTE: O AUTOR.

6.2 PADRONIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DO GENOMA VIRAL

A extração do genoma viral foi padronizada utilizando kit comercial para extração de genoma viral DNA/RNA. A mediana da concentração de DNA extraído das 51 amostras foi de 18,45 µg/µL (3,5 – 125,5) e da concentração de RNA extraído foi de 14,18 µg/µL (3,65 – 97,8). Dentro desse espectro de concentração, não foi necessário diluir as amostras para a obtenção de amplificação. Obteve-se amostras positivas para vírus DNA com concentração de extraído entre 3,5 e 25,2 µg/µL e para vírus RNA com concentração de extraído entre 4,45 e 12,7 µg/µL.

6.3 VALIDAÇÃO DO PROTOCOLO DE PCR SIMULTÂNEO

A validação do protocolo simultâneo se fez por meio do teste com amostras de fezes conhecidamente positivas para cada vírus investigado. As amostras positivas doadas pelo Lacen/PR foram submetidas à PCR *multiplex* do kit comercial Seeplex® Diarrhea-V ACE Detection para confirmar se o genoma dos vírus mantinham-se viáveis e detectáveis. Como ilustrado na FIGURA 6, houve amplificação dos controles internos (1000pb), de HAdV (411pb) e de HAstV (650pb), mas nenhuma das duas amostras referentes a NoV foram amplificadas. O peso molecular faz parte do kit e contém apenas as bandas referentes aos tamanhos dos *amplicons* detectados por este ensaio. Para concluir a validação do protocolo e obtenção de um controle positivo de NoV, foi utilizada a amostra fecal 2798/05 do Laboratório de Virologia do HC que foi detectada pelo mesmo kit em um segundo momento (resultado não demonstrado).

Após definidos, os controles positivos foram testados no protocolo em padronização. Conforme a FIGURA 7 não houve amplificação da amostra positiva de HAstV. A β-globina endógena foi utilizada como controle interno de extração e também não foi obtida amplificação em nenhuma das amostras testadas. As reações de RT-PCR de AstV e β-globina foram repetidas sem diluição e com diluição 1:10, 1:100 e 1:1000, mas não foi possível detectar resultado positivo.

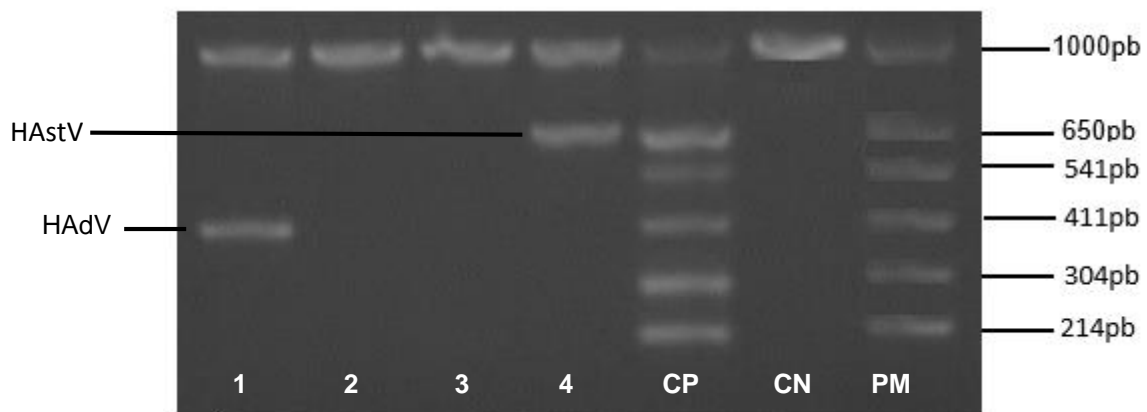


FIGURA 6 - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 2% DO PRODUTO AMPLIFICADO DAS AMOSTRAS FECAIS POSTIVAS PARA HADV, NOV E HASTV UTILIZANDO O KIT SEEPLEX® DIARRHEA-V ACE DETECTION. LEGENDA: 1- AMOSTRA HADV; 2- AMOSTRA NOV; 3 – AMOSTRA NOV; 4 – AMOSTRA HASTV; CP – CONTROLE POSITIVO; CN – CONTROLE NEGATIVO; PM – PESO MOLECULAR. FONTE: O AUTOR.

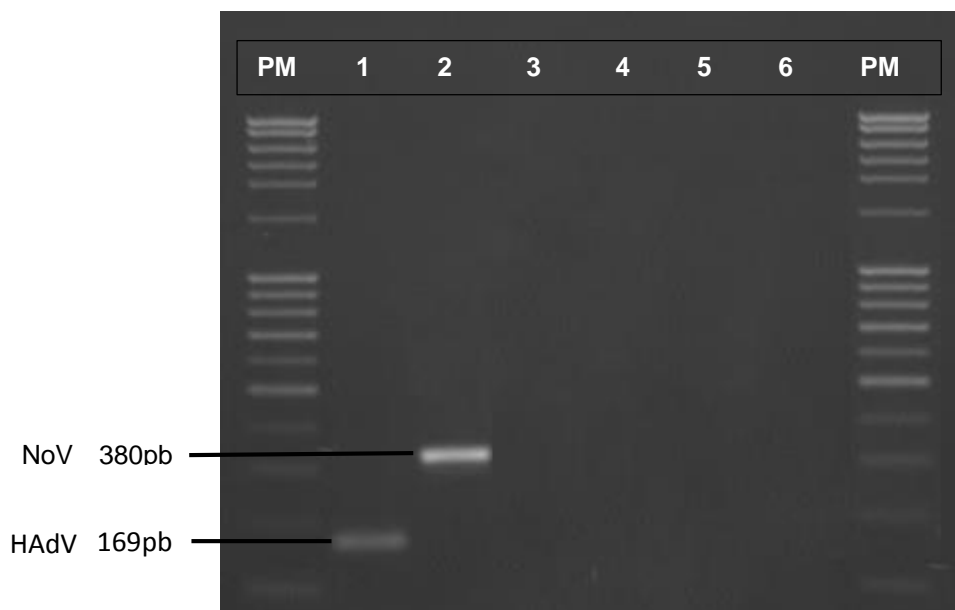


FIGURA 7 - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 2% DO PRODUTO AMPLIFICADO DAS AMOSTRAS FECAIS POSTIVAS PARA HADV, NOV E HASTV UTILIZANDO O PROTOCOLO DE PCR SIMULTÂNEO EM PADRONIZAÇÃO. LEGENDA: PM – PESO MOLECULAR 1KB. 1 – HADV +; 2 NOV +; 3 – HASTV -; 4 – B-GLOBINA AMOSTRA HADV; 5 – B-GLOBINA AMOSTRA NOV; 6 – B-GLOBINA AMOSTRA HASTV. FONTE: O AUTOR.

Como se trata da padronização de um protocolo com fim de diagnóstico clínico, é necessário a utilização de um controle de reação. Já que a β -globina endógena em fezes se mostrou ineficaz, utilizou-se o DNA exógeno de plasmídeo de PRV. Apesar do PRV possuir iniciadores para PCR *nested*, é possível visualizar o

produto da 1ª PCR do PRV em eletroforese gel de agarose, conforme ilustrado na FIGURA 8.

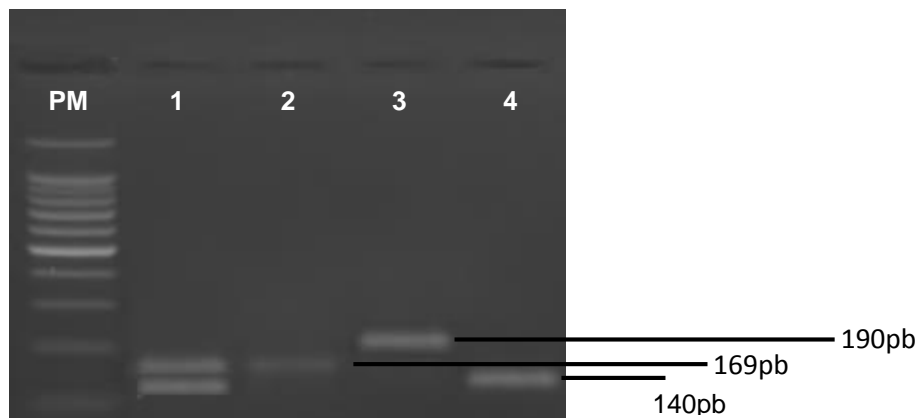


FIGURA 8 - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 2% DO PRODUTO AMPLIFICADO DAS AMOSTRAS DE HADV E PRV. LEGENDA: PM – PESO MOLECULAR 100PB; 1 – 2º PCR DE HADV+PRV; 2 – 2º PCR HADV; 3 – 1ª PCR HADV+PRV; 4 – 2º PCR PRV. FONTE: O AUTOR.

6.4 CLONAGEM DOS PRODUTOS DOS CONTROLES POSITIVOS

Em cada um dos três processos de clonagem foram obtidas, após a etapa de transformação das bactérias, colônias brancas – possíveis clones do inserto. Dez destas colônias foram transpostas para uma placa mãe e submetidas a PCR em que se verificou que 100% das colônias testadas continham o inserto clonado. As FIGURAS 9 e 10 ilustram o resultado de transformação das bactérias e a PCR para a detecção do inserto, respectivamente.

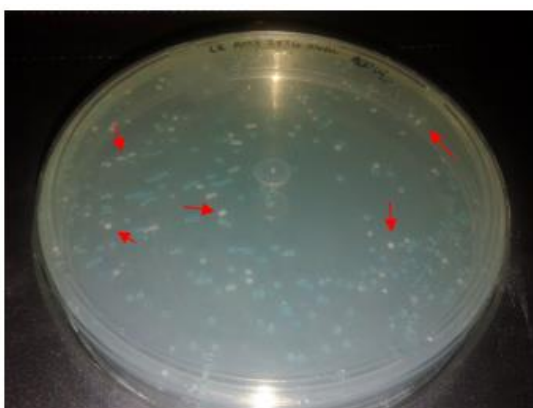


FIGURA 9 – PLACA DE MEIO LB SÓLIDO AMPICILINA/IPTG/X-GAL SEMEADA COM 100µL DE BACTÉRIAS TRANSFORMADAS COM INSERTO DE HASTV. LEGENDA: SETAS VERMELHAS DESTACAM UFC BRANCAS – POSSÍVEIS CLONES DO INSERTO. FONTE: O AUTOR.

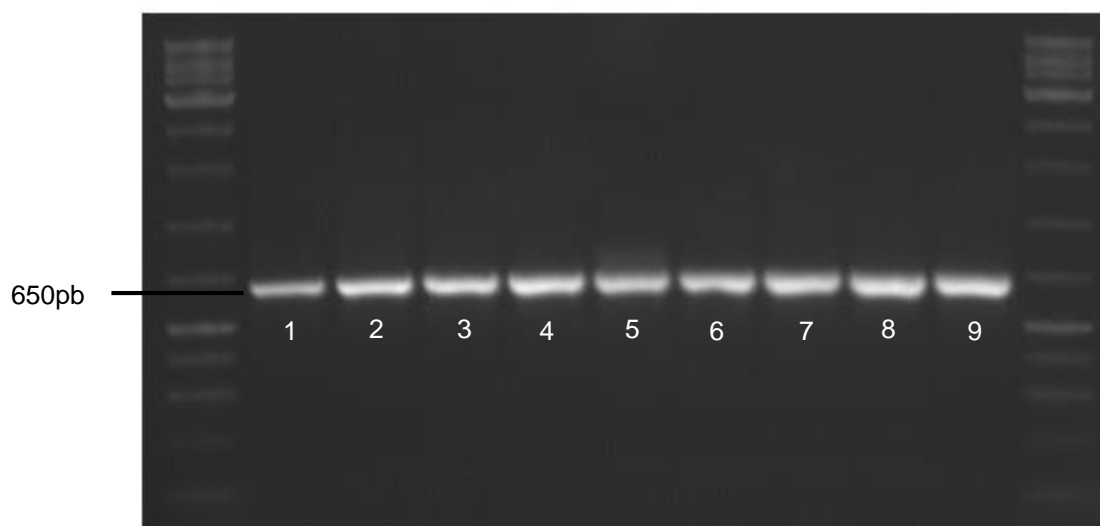


FIGURA 10 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 2% DO PRODUTO DA AMPLIFICAÇÃO DOS INSERTOS. LEGENDA: 1 – 9 CLONES ASTROVÍRUS. EXTREMIDADES PESO MOLECULAR DE 1KB.

FONTE: O AUTOR.

6.5 INVESTIGAÇÃO VIRAL NAS AMOSTRAS CLÍNICAS

Das 51 amostras avaliadas, uma já era conhecida positiva para rotavírus por ensaio imunoenzimático desempenhado como rotina diagnóstica no Laboratório de Virologia HC-UFPR, 7 (13%) foram identificadas como positivas para adenovírus e 2 (4%) como positivas para norovírus. Não houve nenhum caso de coinfecção. No total, as gastroenterites virais foram responsáveis por 19% das diarreias agudas investigadas. Dentre os vírus identificados, houve maior prevalência da infecção por adenovírus; sendo, este, responsável por 70% das infecções. Em três amostras não se obteve amplificação do controle de reação mesmo em replicatas, portanto foram consideradas indefinidas (FIGURA 11).

Em relação à concordância com outro método diagnóstico, verificou-se uma discrepância de resultado na amostra 1046. Quando avaliada por teste rápido baseado em imunocromatografia, esta amostra resultou como negativa para adenovírus, mas pelo método de PCR mostrou-se positiva.

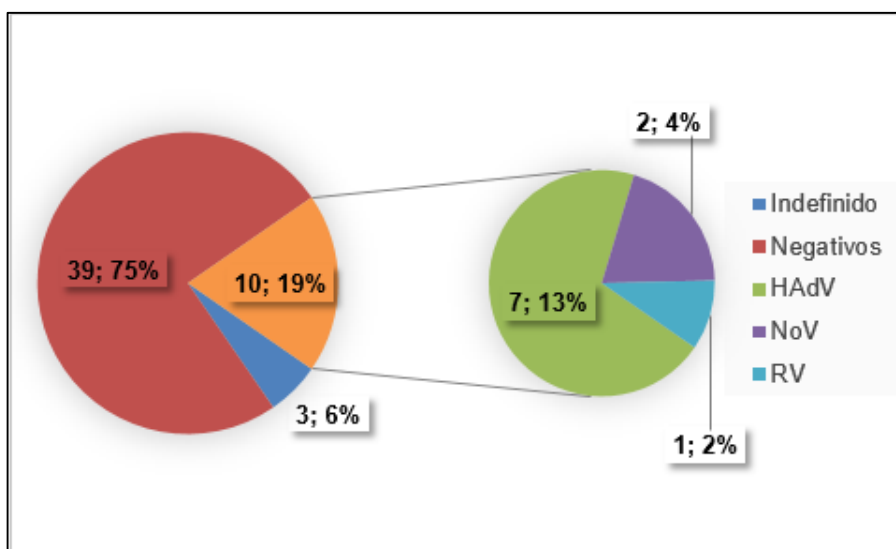


FIGURA 11 – FREQUÊNCIA DE GASTROENTERITE VIRAL POR RV, HAdV E NoV NAS 51 AMOSTRAS AVALIADAS NO ANO DE 2014 NO HOSPITAL DE CLÍNICAS/UFPR.
FONTE: O AUTOR.

6.6 CARACTERIZAÇÃO DEMOGRÁFICA

A mediana de idade dos pacientes foi de 6 anos (0,08 – 76 anos), sendo que 80% dos pacientes se enquadram na faixa etária infantil, dos quais metade correspondem a crianças menores de 2 anos. Não houve diferença entre o sexo dos pacientes infectados e a maioria dos casos foram identificados em pacientes internados. Os casos de norovírus se associaram a pacientes adultos e a maioria dos casos de adenovírus a crianças menores que cinco anos (TABELA 1).

TABELA 1 – CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO ACOMETIDA POR GASTROENTERITE VIRAL NO ANO DE 2014 NO HOSPITAL DE CLÍNICAS UFPR.

Amostra	Agente Etiológico	Idade	Sexo	Internado
2749	adenovírus	13 anos	F	Sim
2628	adenovírus	0,7 anos	F	Não
2400	adenovírus	1,5 anos	F	Não
2253	adenovírus	0,7 anos	M	Sim
2198	adenovírus	76 anos	F	Sim
1908	adenovírus	0,08 anos	F	Não
1046	adenovírus	8 anos	F	Sim
2562	norovírus	40 anos	M	Sim
2488	norovírus	13 anos	M	Sim
2414	rotavírus	6 anos	M	Sim

FONTE: O AUTOR

Em relação à distribuição de casos positivos de gastroenterites virais identificados por período, verificou-se uma concentração dos casos nos meses de setembro e outubro e acompanhou o crescimento das solicitações de exames para investigação viral em amostra com diarreia, sugerindo que tenha ocorrido nesse período um surto de gastroenterites (FIGURA 12).

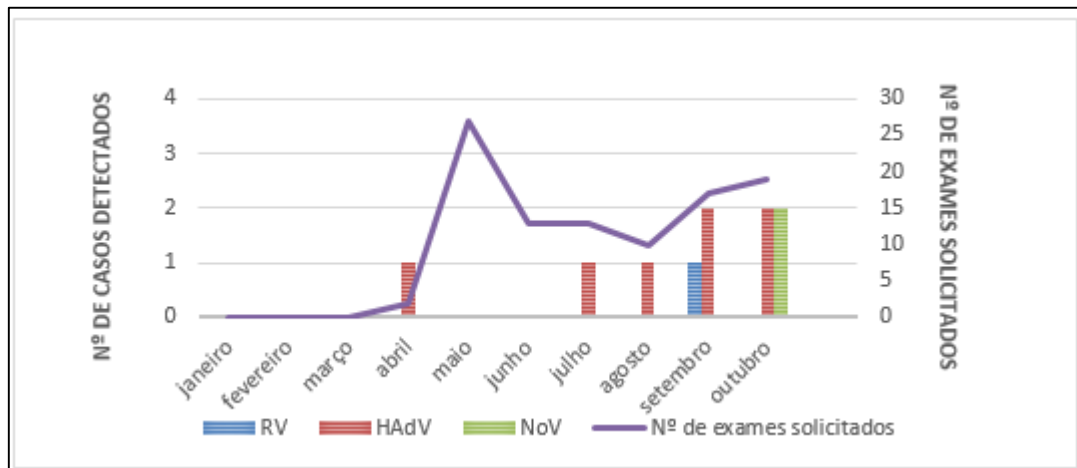


FIGURA 12 – NÚMERO DE EXAMES SOLICITADOS PARA INVESTIGAÇÃO VIRAL EM GA E CASOS DIAGNOSTICADOS POR PERÍODO NO ANO DE 2014 HC-UFPR.
FONTE: O AUTOR.

7 DISCUSSÃO

Em estudo anterior Raboni *et al.* (2014) validaram técnicas de PCR para investigação seriada de vírus entéricos em diarreias agudas. Para HAdV foi estabelecido PCR *nested* com temperatura de anelamento a 56° C. Para NoV e HAstV, RT-PCR com temperatura de anelamento de 50° C. Como controle interno de reação utilizou-se o plasmídeo de PRV. Os resultados do PCR *nested* para HAdV em gradiente de temperatura demonstraram que há amplificação de HAdV à mesma temperatura de anelamento de NoV e HAstV, permitindo a execução do mesmo protocolo de termociclagem para a investigação dos três vírus simultaneamente. Observou-se também uma eficiente amplificação do gene constitutivo β -globina a 50° C, o que possibilitaria a utilização deste como controle de extração e reação.

Algumas vantagens de utilizar a β -globina como controle de extração em relação ao plasmídeo PRV valem ser discutidas. Primeiramente, esta é um gene constitutivo de células humanas, portanto, não há a necessidade de nenhuma interferência para sua adição durante o processo de extração, diminuindo resultados falso-negativos por erros de técnica. Diferentemente do PRV, a β -globina realmente é extraída, desta forma, é um controle de extração mais fidedigno devido à semelhança com todo processo a que o material viral será exposto. O tamanho da banda da β -globina (268pb) se distancia das bandas dos vírus investigados, enquanto que as bandas do PRV (190pb e 140pb) separam-se tenuemente da banda do HAdV (169pb) dependendo da qualidade da eletroforese – havendo casos de sobreposição. Por fim, a adição de um material genético externo, suscita a discussão entre diversos pesquisadores da possibilidade de gerar falsos negativos por competição. Além disso, em casos de baixa viremia, a reação pode ser deslocada para a amplificação do PRV em detrimento do alvo viral (ALBUQUERQUE, 2014).

Em relação a padronização da extração de genoma viral utilizando kit comercial, observou-se uma grande variação na concentração final do material extraído de cada uma das 51 amostras (variação entre 3,5 e 125,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), mas comparando a performance entre a extração de DNA e RNA, foi possível observar que apesar de ser um material de difícil recuperação, a concentração de RNA obtida foi equivalente à de DNA com medianas e extremos equivalentes. Verificou-se

amplificação entre concentrações na faixa de Log10 [0] e Log10 [2], não sendo verificada inibição de amplificação por excesso de material nas amostras dentro dessas concentrações. Houve três casos que a amplificação foi ineficaz, a PCR dessas amostras foram repetidas utilizando três diluições seriadas 1:9, 1:99, 1:999 e mesmo assim não obteve-se amplificação. Essas amostras estão dentro das concentrações de extração de material que se mostrou eficiente sem a necessidade de diluição, portanto atribui-se a falha da amplificação a outros inibidores constituintes deste material biológico devido a um processo falho durante a clarificação.

É descrito na literatura que astrovírus seja uma das principais causas de diarreia aguda em bebês e crianças menores de cinco anos hospitalizados (MITCHELL, 2002) e os poucos estudos desenvolvidos no Brasil obtiveram uma faixa de detecção deste vírus entre 2% a 5% das diarreias agudas (SILVA *et al.*, 2001). Entretanto, o trabalho anterior desenvolvido por Raboni *et al.* (2014) avaliando 225 amostras de crianças hospitalizadas no HC- UFPR não detectou nenhuma caso positivo para astrovírus. A validação do protocolo de PCR do presente trabalho demonstrou que há falha no protocolo adotado para a detecção de astrovírus, pois este não foi capaz de amplificar a amostra positiva previamente confirmada por PCR *multiplex* em nenhuma replicata do protocolo em padronização. Portanto, o produto do HAstV da PCR *multiplex* foi clonado para futuro sequenciamento e desenho de iniciadores e posterior inclusão na PCR simultânea para investigação de gastroenterites virais.

Apesar das vantagens de se utilizar a β -globina endógena como controle interno de extração, não se sabe o motivo dela não funcionar em amostras fecais - apesar de ter funcionado na padronização da técnica quando testada em amostra de urina. Uma hipótese é o processo de clarificação a que são submetidas as fezes. Este tem por objetivo diminuir os inibidores de reação que estão em grandes quantidades no material fecal. Dentre os outros materiais biológicos que não são submetidos a esse processamento é conhecido que amostras com baixo conteúdo celular, como LCR, têm a amplificação de β -globina diminuída e amostras com alto conteúdo celular, como urina, têm alta amplificação, o que se justifica pela proporção direta célula/ β -globina. Caso o tampão de clarificação, unido à longa centrifugação, consiga interferir significativamente na quantidade celular do sobrenadante do clarificado, esse

processamento pode justificar a falta de amplificação de β -globina em PCR de amostras fecais.

Como as bandas dos produtos da 2ª PCR de HAdV e PRV são muito próximas, dependendo da qualidade da reação de amplificação e da eletroforese, a posição da bandas no gel de eletroforese do produto da 2ª PCR de PRV em amostras investigadas para HAdV pode suscitar dúvidas de interpretação, pois em casos de visualização de apenas uma banda, esta pode se tratar de uma banda referente ao PRV - amostra negativa - ou pode se tratar de uma amostra positiva que não apresente amplificação de PRV por competição. Visto isto, decidiu-se não realizar *nested* para o PRV e confirmar sua amplificação realizando gel da 1ª PCR HAdV,PRV.

Não se observou alteração do tamanho do inserto clonado, eventual resultado da clonagem em sistema procarionte devido a taxa de erro de replicação, característica inerente à DNA polimerase bacteriana (NASCIMENTO *et al.*, 1999). O gel de eletroforese da PCR dos insertos mostra que se obteve uma amplificação eficiente – bandas fortes, bem delimitadas e sem gerar fragmentos inespecíficos.

Das 101 amostras fecais enviadas ao Laboratório de Virologia HC-UFPR para investigação de rotavírus, apenas 51% eram fezes diarreicas e justificavam a realização da investigação viral. Essa falta de mensuração dos critérios para solicitação de exames laboratoriais geram gastos injustificáveis, pois a identificação de vírus entéricos em fezes não diarreicas não possuem relevância clínica, uma vez a via de eliminação desses patógenos é fecal e estes podem ser detectados, sem que estejam associados à doença (DOMÍNGUEZ *et al.*, 2009).

A identificação de apenas 1 rotavírus no ano de 2014 está em concordância com o impacto da introdução da vacina RVA com a significativa redução da incidência de gastroenterites virais por rotavírus demonstrados em estudos tanto na população brasileira, quanto na população do HC-UFPR. Após 2006 houve uma queda de até 30% das infecções por este agente, que não mais se refere como o principal causador de diarreias agudas em crianças (PEREIRA *et al.*, 2013).

A prevalência mundial de HAdV em estudos anteriores varia entre 0,7% e 30% (DOMÍNGUEZ *et al.*, 2009). Estudos realizados no Brasil vêm identificando uma prevalência de HAdV entre 2% a 15% das diarreias agudas de acordo com a região e o método de detecção (RABONI *et al.*, 2014). As frequências mais baixas podem estar

subestimadas devido à sensibilidade da técnica de detecção de antígeno em fezes. A introdução de métodos moleculares para estudar este vírus tem levado a um aumento significativo na frequência de detecção HAdV (ROHAYEM *et al.*, 2004). Apesar da incidência de 13% de HAdV encontradas no presente estudo estar de acordo com o esperado, esse resultado pode não refletir a real participação do HAdV na causa de diarreias agudas, uma vez que os iniciadores utilizados para a amplificação do vírus não é específico para adenovírus entérico e pode ter detectado a eliminação de HAdV relacionados com outros quadros infecciosos. Para tentar descartar essa suspeita, todos pacientes com amostras HAdV positivas foram investigados para a exclusão de infecções respiratórias. À exceção do paciente 2198 que foi a óbito por Síndrome Respiratória Aguda e possuía diagnóstico de coinfeção influenza A/adenovírus, nenhum dos outros 6 pacientes apresentam qualquer quadro ou suspeita de infecção respiratória. Contudo, apenas com a caracterização do vírus amplificado por sequenciamento poderá verificar se estes se tratavam dos subtipos entéricos (40 ou 41).

Norovírus foi o segundo vírus mais incidente dentre as amostras investigadas, mas apresentou uma taxa de positividade relativamente baixa (4%). Entretanto quando avaliados os casos de gastroenterites virais no Paraná até a semana epidemiológica 16 do ano de 2014, verifica-se que o norovírus teve maior incidência, seguido de rotavírus (CIEVS, 2014). Esta discrepância de resultado pode ser justificada porque as semanas de a 1-16 referem-se aos meses de janeiro a abril, em que praticamente não houve solicitação de exames para investigação de gastroenterites virais. Essa diferença de perfil pode ser justificada pela infecção por norovírus ser característico em adultos expostos a surtos e a população investigada no Laboratório de Virologia do HC-UFPR, se refere a uma maioria de pacientes internados, pediátricos e adultos imunossuprimidos, portanto devido ao perfil da população avaliada no HC-UFPR é esperado que se encontrem mais adenovírus e rotavírus em detrimento de norovírus.

Raboni *et al.* (2014) em estudo anterior obteve uma incidência de gastroenterites virais de 26% entre amostras de crianças internadas no HC-UFPR no período de setembro de 2010 a setembro de 2011. Considerando que no presente estudo não houve restrição quanto ao tipo de paciente incluído no estudo e que é de se esperar uma taxa de incidência mais elevada ao investigar apenas crianças

hospitalizadas – grupo que apresenta maior frequência de doença por estes vírus –, pode-se concluir que a incidência de 19% de gastroenterites virais encontradas neste trabalho está em concordância de dados observados no estudo anterior realizado no HC-UFPR. Com o desenho de iniciadores que propiciem a amplificação de HAsV espera-se que essa taxa de incidência de diarreias agudas virais atinja pelo menos 30%, pois os HAsV são reconhecidos como uma das principais causas mais comum de gastroenterite viral em bebês e crianças jovens hospitalizadas (MITCHELL, 2002).

A partir dos resultados obtidos neste trabalho foi possível observar que os agentes virais são significativamente incidentes nos quadros de diarreia aguda, afetando principalmente crianças. Apesar do pouco número de casos, norovírus pareceu estar relacionado com doença em adultos e foi diagnosticado durante período de provável surto, enquanto infecções por adenovírus foram detectados prioritariamente em crianças, à exceção da paciente que foi a óbito por agravamento de SRAG, cuja suspeita é de que o HAdV amplificado não se trate de um subtipo entérico.

8 CONCLUSÕES

O presente trabalho padronizou um único programa de termociclagem para amplificação de HAdV, HAstV e NoV, mas não conseguiu padronizar um protocolo simultâneo de diagnóstico para esses vírus devido à necessidade de PCR *nested* para detecção do HAdV e pela falha dos iniciadores de HAstV.

A detecção de produtos na validação do protocolo de PCR e na investigação viral das amostras clínicas demonstrou que a extração do genoma viral em amostras fecais utilizando kit comercial está padronizada e é para detectar infecções por HAdV e NoV neste tipo de material biológico utilizando o programa de termociclagem unificado.

A partir da clonagem dos produtos de HAdV, NoV e HAstV, obteve-se material para posteriores análises como o sequenciamento do HAstV e também uma fonte renovável de controles positivos no caso da investigação desses vírus como rotina.

As gastroenterites virais foram responsáveis por 19% das diarreias agudas avaliadas. Adenovírus foi o agente etiológico mais identificado (70% entre as amostras positivas), responsável por 7 casos de GA (13%) no HC-UFPR no ano de 2014. Norovírus foi responsável por 2 casos (4%) e rotavírus por 1 caso (2%). Coinfecções não foram observadas. Apesar dos pacientes não apresentarem sintomas de quadro respiratório, apenas o sequenciamento dos produtos de HAdV permitirá confirmar a alta frequência de diarreias agudas causadas por este vírus.

A maioria dos pacientes infectados eram crianças e 40% destas eram menores de 2 anos. Não houve diferença entre o gênero dos pacientes. Apesar dos poucos casos, infecções por norovírus se relacionaram com doença em adultos, adenovírus e rotavírus na população infantil. Os casos de infecção aconteceram principalmente nos meses de setembro e outubro, acompanhando um período de aumento de solicitação de exames, o que sugere que nestes meses tenha ocorrido surto de gastroenterites agudas.

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como perspectivas para esta pesquisa sugere-se o sequenciamento dos adenovírus positivos para a confirmação de que realmente se tratam dos subtipos entéricos (40 ou 41); o desenho de iniciadores sobre o resultado do sequenciamento do astrovírus clonado para que este possa ser incluído na investigação de gastroenterites virais, a junção dos RT-PCR a fim de tornar o diagnóstico de NoV e HAstV *duplex* e a otimização da PCR para HAdV, para que não se necessite de PCR *nested* para sua detecção e assim a identificação de HAdV, HAstV, NoV possa se tornar simultânea.

Outra questão em aberto é a utilização da β -globina como controle de extração em fezes. A adoção deste controle traria economia ao teste, uma vez que não se faria necessária a inserção de plasmídeo na extração, nem a eletroforese do 1º PCR do HAdV. Além disso a hipótese de falsos negativos por competição seria completamente descartada. Entretanto mais testes necessitam ser realizados para que se proponha uma solução ou justificativa do porquê, mesmo sendo um gene constitutivo, em fezes a amplificação da β -globina foi ineficaz.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, S. C. G. **Otimização de ferramentas moleculares baseadas em multiplex PCR para inclusão de controles de qualidade amostral no diagnóstico das leishmanioses**. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Saúde), Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz. Recife, 2014.

AVELLÓN, A.; PÉREZ, P.; AGUILAR, J. C.; LEJARAZU, R.; ECHEVARRÍA, J. E. Rapid and sensitive diagnosis of human adenovirus infections by a generic polymerase chain reaction. **J Virol Methods**, v. 92, p. 113-120, 2001.

BERN, C.; GLASS, R. I. Impact of diarrheal diseases worldwide. **Viral Infections of the Gastrointestinal Tract**, ed. 2, p.1-26, New York: Marcel Dekker, 1994.

BLACK, R. E.; COUSENS, S.; JOHNSON, H. L.; LAWN, J. E.; RUDAN, I.; BASSANI, D. G.; JHA, P.; CAMPBELL, H.; WALKER, C. F.; CIBULSKIS, R.; EISELE, T.; LIU, L.; MATHERS, C. Global, regional and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. **Lancet**, v. 375, p. 1969-1987, The child health epidemiology reference group of WHO, UNICEF: 2010

BOSCHI-PINTO, C.; VELEBIT, L.; SHIBUYA, K. Estimating child mortality due to diarrhoea in developing countries. **Bull World Health Organ**, v. 86, p. 710-717, 2008.

CICIRELLO, H. G.; GLASS, R. I. Current concepts of the epidemiology of diarrheal diseases. **Seminars in Pediatric Infectious Diseases**, v. 5, p.163-167, 1994.

CIEVS. **Informe epidemiológico**. Eventos – Semana Epidemiológica 16/2014. Disponível em: <http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/INFORME_SEMANAL_CIEVS_40.pdf>. Acesso em 29 de novembro de 2014.

DEBBINK, K.; LINDESMITH, L. C.; DONALDSON, E. F.; BARIC, R. S.. Norovirus Immunity and the Great Escape. **PLoS Pathog**, v.8(10), p.1002921, 2012.

DOMÍNGUEZ, A.; GODOY, P.; TORNER, N.; CARDEÑOSA, N.; MARTÍNEZ, A. Las gastroenteritis víricas: un problema de salud pública. **Rev Esp Salud Publica**, v. 83, p. 679-687, 2009.

EDEN, J. S.; TANAKA, M. M.; BONI, M. F.; RAWLINSON, W. D.; WHITE, P. A. Recombination within the Pandemic Norovirus GII.4 Lineage. **J. Virol.**, v.87(11), p. 6270-82, 2013.

GUERRANT, R. L.; VAN GILDER, T.; STEINER, T. S.; THIELMAN, N. M.; SLUTSKER, L.; TAUXE, R. V.; HENNESSY, T.; GRIFFIN, P. M.; DUPONT, H.; SACK, R. B.; TARR, P.; NEILL, M.; NACHAMKIN, I.; RELLER, L. B.; OSTERHOLM, M. T.; BENNISH, M. L.; PICKERING, L. K. Practice guidelines for the management of infectious diarrhea. **Clin. Infect. Dis.**, v. 32(3), p. 331, 2001.

MARTINES, J.; PHILLIPS, M.; FEACHEM, R. G. Diarrheal diseases. **Evolving Health Sector Priorities in Developing Countries**, p.1-49 Washington, DC: World Bank, 1991.

MITCHELL, D. K. Astrovirus gastroenteritis. **Pediatr Infect Dis**, v. 21, p. 1067-1069, 2002.

MORAES, A. C.; CASTRO, F. M. M. Diarreia Aguda. **RIPSA: JBM**, v. 102, p. 21-27, 2014.

NASCIMENTO, A. A. C.; ESPREAFICO, E. M.; LARSON, M. L. P.; MONESI, N.; ROSSI, N. M. M.; RODRIGUES, V. **Tecnologia do DNA recombinante**. p. 85, Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 1999.

NOEL, J. S.; LEE, T. W.; KURTZ, J. B.; GLASS, R. I.; MONROE, S. S. Typing of human astroviruses from clinical isolates by enzyme immunoassay and nucleotide sequencing. **J Clin Microbiol**, v. 33, p. 797-801, 1995.

PEREIRA, L. A.; RABONI, S. M.; NOGUEIRA, M. B.; VIDAL, L. R.; ALMEIDA, S. M.; DEBUR, M. C.; CRUZ, C. Rotavirus infection in a tertiary hospital: laboratory diagnosis and impact of immunization on pediatric hospitalization. **Braz J Infect Dis** v.15, p. 215-219, 2011.

POZO, F.; TENORIO, A. Detection and typing of lymphotropic herpesviruses by multiple polymerase chain reaction. **J Virol Meth**, v. 79,p. 9-19, 1999.

PROMEGA CORPORATION. pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems. **Tecchnical Manual**. 2010.

RABONI, S. M.; DAMASIO, G. A. C.; FERREIRA, C. E. O.; PEREIRA, L. A.; NOGUEIRA, M. B.; VIDAL, L. R.; CRUZ, C. R.; ALMEIDA, S. M. Acute gastroenteritis

and enteric viruses in hospitalised children in southern Brazil: aetiology, seasonality and clinical outcomes. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 109(4), p. 428-435, Rio de Janeiro, 2014.

RAMANI, S.; KANG, G. Viruses causing childhood diarrhoea in the developing world. **Curr Opin Infect Dis**, v. 22, p. 477-482, 2009.

RIPSA - Rede Interagencial de Informação para a Saúde Brasil. **Indicadores básicos para a saúde no Brasil: conceitos e aplicações**, 2008. Disponível em: <tabnet.datasus.gov.br/tabdata/livroidb/2ed/indicadores.pdf>. Acessado em 22 de novembro de 2014.

SANTOS, R. A. T.; BORGES, A. M. T.; DA COSTA, P. S. S.; TEIXEIRA, J. M. S.; GIUGLIANO, L. G.; LEITE, J. P. G.; CARDOSO, D. D. P. Astrovirus infection in children living in the Central West Region of Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 209-213, 2007.

SANTOS, R. A.; CARDOSO, D. D. Astrovírus. **Rev Patol Trop**, v. 34, p. 161-174, 2005.

STROPARO, E.; CRUZ, C. R.; DEBUR, M. C.; VIDAL, L. R.; NOGUEIRA, M. B.; ALMEIDA, S. M.; PEREIRA, L. A.; ROTTA, I.; RABONI, S. M. Adenovirus respiratory infection: significant increase in diagnosis using PCR comparing with antigen detection and culture methods. **Rev Inst Med Trop** v. 52, p. 317-32, 2010.

SILVA, A. M. V.; LEITE, E. G.; ASSIS, R. M. S; MAJEROWICZ, S.; LEITE, J. P. G. An outbreak of gastroenteritis associated with astrovirus serotype 1 in a day care center, in Rio de Janeiro, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 1069-1073, 2001.

VAN, R.; WUN, C.; O'RYAN, M. L.; MATSON, D. O.; JACKSON, L.; PICKERING, L. K. Outbreaks of human enteric adenovirus types 40 and 41 in Houston day care centers. **J Pediatr.**, v. 120, p. 516-21, 1992.

VINJÉ, J.; KOOPMANS, M. P. Molecular detection and epidemiology of small round-structured viruses in outbreaks of gastroenteritis in the Netherlands. **J Infect Dis**, v. 174, p. 610-615, 1996.

WALSH, M. P.; SETO, J.; JONES, M. S.; CHODOSH, J.; XU, W. Computational analysis identifies human adenovirus type 55 as a re-emergent acute respiratory disease pathogen. **J Clin Microbiol**, v. 48, p. 991-993, 2010.

WARDLAW, T.; SALAMA, P.; BROCKLEHURST, C.; CHOPRA, M.; MASON, E. Diarrhoea: why children are still dying and what can be done. **Lancet**, v. 375, p. 870-872, 2010.

WGO. Diarreia aguda em adultos. **Practice Guidelines** Disponível em: <http://www.worldgastroenterology.org/assets/downloads/pt/pdf/guidelines/diarreia_aguda_em_adultos_pt.pdf>. Acessado em 22 de novembro de 2014.

WHO- World Health Organization. Global Burden of Disease estimates. **Update**, 2008.

WOLD, W. S.; HORWITZ, M. S. Adenoviruses. **Fields virology**, p. 2395-2436, 2007.